

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number:

07-126294

(43) Date of publication of application: 16.05.1995

(51)Int.CI.

C07K 14/47 C12N 9/99 // A23L 1/30 A61K 38/55

(21)Application number: 06-047711

(71)Applicant:

SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing:

22.02.1994

(72)Inventor:

SERIZAWA ATSUSHI

ISHIKAWA HIDETOSHI TAKAYAMA TOMOSHIGE

(30)Priority

Priority number: 05125164

Priority date: 28.04.1993

Priority country: JP

(54) NEW CYSTEINE PROTEASE INHIBITOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the inhibitor having a high cysteine protease inhibitory effect, capable of inhibiting absorption of bone by osteoclast and useful as a raw material for medicines and foods.

CONSTITUTION: A cysteine protease inhibitor has following properties: (1) an affinity to an immobilized carboxymethylated papain. (2) an inhibitory effect on papain. (3) the molecular weight of 16±2KDa (by SDS-PAGE) or 13±2KDa, and (4) the N-terminal amino acid sequence of the sequence no. 1 or 2 in the sequence table.

Aig Die Bly Asp auf les Val Cly Gle Leu Glu Gla leu Ger Pro Ann day Are 610 Yel Gia Lya 4

Cly Ast A. The Let Gib The Lett Gin Gin Lett See Pro Asa Asp Pro 10 E'n Tei Gir las

IL

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3460851

[Date of registration]

15.08.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-126294

(43)公開日 平成7年(1995)5月16日

(51)Int.Cl. ° 識別記号 FI CO7K 14/47 8318-4H 9152-4B C12N 9/99 ZNA // A23L 1/30 A61K 38/55 ABJ A61K 37/64 ABJ 審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全13頁) (71)出願人 000006699 (21)出願番号 特願平6-47711 雪印乳業株式会社 (22)出願日 平成6年(1994)2月22日 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 (72)発明者 芹澤 篤 (31) 優先権主張番号 特願平5-125164 北海道札幌市東区本町一条4丁目3-15-203 (32)優先日 平 5 (1993) 4 月28日 (33)優先権主張国 日本(JP) (72)発明者 石川 秀敏 北海道札幌市西区八軒一条東2丁目2-33 -606(72)発明者 高山 朋栄 北海道恵庭市有明町785 (74)代理人 弁理士 藤野 清也

(54)【発明の名称】新規システインプロテアーゼインヒビター

(57)【要約】

(修正有)

【構成】 次の特性を有するシステインプロテアーゼインヒビター。

- (1) 固定化したカルボキシメチル化パパインに結合性 を有する。
- (2) パパインに対する阻害活性を有する。
- (3) 分子量16±2KDa (SDS-PAGEによ
- る) または13±2KDa。
- (4)配列表配列番号1又は2のN末端アミノ酸配列を 有する。

矽

Arg Pro Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Ass

5 10 15 (1)

Asp Pro Gin Val Glu Lys

20

欧列

Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Sar Pro Asn Asp Pro

1 5 10 15 (2)

Gin Val Gin Lys

20

【効果】 高いシステインプロテアーゼ阻害活性を示し、破骨細胞による骨吸収を抑制する。医薬、食品の原料として有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記特性を有するシステインプロテアー ゼインヒピター。

- (1) 固定化したカルボキシメチル化パパインに結合性 を有する。
- (2) パパインに対する阻害活性を有する。
- (3) SDS-PAGEによる分子量測定で16±2K Daまたは13±2KDaを示す。
- (4) 配列表配列番号1で表されるN末端アミノ酸配列 を有する。

【請求項2】 下記特性を有するシステインプロテアー ゼインヒビター。

- (1) 固定化したカルボキシメチル化パパインに結合性 を有する。
- (2) パパインに対する阻害活性を有する。
- (3) SDS-PAGEによる分子量測定で16±2K Daまたは13±2KDaを示す。
- (4) 配列表配列番号2で表されるN末端アミノ酸配列 を有する。

ゼインヒビター。

- (1) 固定化したカルボキシメチル化パパインに結合性 を有する。
- (2) パパインに対する阻害活性を有する。
- (3) SDS-PAGEによる分子量測定で16±2K Daまたは13±2KDaを示す。
- (4) 配列表配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【請求項4】 下記特性を有するシステインプロテアー ゼインヒビター。

- を有する。
- (2) パパインに対する阻害活性を有する。
- (3) SDS-PAGEによる分子量測定で16±2K Daまたは13±2KDaを示す。
- (4) 配列表配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【産業上の利用分野】本発明は新規なシステインプロテ アーゼインヒビターに関する。本発明により提供される 新規なシステインプロテアーゼインヒビターは破骨細胞 40 の骨吸収作用に対する阻害効果を有し、骨の老化抑制を 目的とした食品原料や医薬品原料として有用である。

[0002]

【従来の技術】システインプロテアーゼインヒビター は、活性中心にSH基を持ったシステインプロテアーゼ のタンパク質分解活性を阻害する物質であり、動物組 織、細胞、血液中や尿中に見出されている。このような システインプロテアーゼインヒビターであって蛋白性の 物質はシスタチンと総称されている。これまでに見出さ れたシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタ 50 品素材から得られ、食品素材として使えるような安全な

チンは、その分子構造から3つのファミリーに分類され ている (Biochem.J., 236, 312 (1986))。この文献によ れば、ファミリー1 (ステフィンファミリー) にはラッ ト肝臓由来のシスタチンβ (Biochem. Biophys. Res. C ommun., 115, 902 (1983))、ラット表皮由来のシスタチ $> \alpha$ (Biochem. Biophys. Res. Commun., 121, 149 (19 84))やヒトの白血球に見出されたステフィンA(Hoppe-S eyler's Z. Physiol. Chem.,364,1487 (1983))が含まれ ている。これらのシスタチンはいずれも分子量約12K 10 Daを示し、糖を持たない。

【0003】また、ファミリー2には、ヒト尿由来のシ スタチンC(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.79, 3024 (1982))、卵白シスタチン(Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 364, 1487 (1983)) がこのファミリーに分類さ れ、ウシ初乳由来のシスタチン(FEBS Lett., 186, 41 (1985))もこのファミリーに属する。このファミリーに 属するものは分子量約13~15KDaを示し、ファミ リー1と同様に糖を有していない。

【0004】さらに、血漿タンパク質であるヒトキニノ 【請求項3】 下記特性を有するシステインプロテアー 20 ーゲン (Biochemistry, <u>23</u>, 5691 (1984))、ラットのT キニノーゲン (Biochem. Biophys. Res. Commun., 129, 280(1985))など、キニノーゲン類がファミリー3を構 成している。キニノーゲン類は分子量78KDaの高分 子キニノーゲンと分子量45KDaの低分子キニノーゲ ンが存在することが知られている。本発明者らは、牛初 乳より、糖鎖を有する、分子量約57KDaの新規なシ スティンプロテアーゼインヒビターを単離しこれを特願 平5-84191として特許出願を行っている。

【0005】システインプロテアーゼインヒビターの有 (1) 固定化したカルボキシメチル化パパインに結合性 30 用な作用の1つとして、ウィルスの増殖阻害作用が確認 されている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 127, 1 072(1985))。また、骨疾患モデルの動物の骨より、カル シウムの遊離を抑制する作用を示すことから、特開平2 -223529号公報には抗アレルギー剤や骨疾患治療 剤としての用途が開示されている。また特開昭61-2 25130号公報には卵白由来のシスタチンを精製し、 これを抗ウイルス剤として使用する技術が開示されてい る。

> 【0006】また特開昭64-2582号公報にはシス タチンαの合成遺伝子、特開平1-71492号公報に はシスタチンBの合成遺伝子、特開平1-157390 号公報にはシスタチンAの合成遺伝子がそれぞれ開示さ れており、遺伝子操作によりシスタチンを生産すること も可能となってきた。

【0007】近年、高齢化の進展にともない、破骨細胞 の骨吸収に起因する骨粗鬆症が急増している。現在、破 骨細胞の吸収活性を抑える医薬として、カルシトニン製 剤がある。しかしこの製剤は、医薬品として、サケやウ ナギ由来のホルモンを利用したホルモン製剤であり、食

考えられる。

3

物質についてはあまり検討されていないのが現状である。

[0008]

【解決しようとする課題】本発明者らは、食品索材から得られる安全でしかも食品素材として使えるよう、乳中に存在することが知られているシステインプロテアーゼインヒビターについて検討をすすめたところ、従来の乳由来のシスタチンとして知られているものと明らかに異なる、新規なシスタチン様の物質を見出した。この物質はシスタチンファミリー2に属するシスタチンCと比較してやや大きな分子量を有しており、またこれまで知られているシスタチン類にない新規なN末端アミノ酸配列を有している。従って本発明は、乳由来の新規なシスタチン様システィンプロテアーゼインヒビターを提供することを課題とする。

[0009]

【課題を解決するための手段】本発明により提供される 乳由来の新規なシスタチン様システインプロテアーゼイ ンヒビターは下記の特性により特定される。

- (1) 固定化したカルボキシメチル化パパインに結合性 20 を有する。
- (2) パパインに対する阻害活性を有する。
- (3) SDS-PAGEによる分子量測定で16±2K Daまたは13±2KDaを示す。
- (4) N末端アミノ酸配列は、配列表配列番号1あるいは配列番号2のアミノ酸配列のいずれかを示す(配列表配列番号2のアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸残基のうち、N末端側2残基に相当するArg-Pro残基が削除され、3番目のGlyから始まったものである)。

【0010】本発明の物質は、乳由来のシスタチンCと して知られている物質やその他のシスタチンファミリーの物質と比較して、そのN末端アミノ酸配列が明らかに異なっており、またホモロジー検索を行ってもこのようなN末端アミノ酸配列を報告した文献はない。本発明の物質は新規な蛋白質である。本発明の物質の分子量は、上記したようにSDS-PAGE、還元、非還元のいずれの条件においても、 16 ± 2 KDa、または 13 ± 2 KDaのいずれかである。この内16 KDaを示す物質はバス染色陽性であることから糖鎖の存在が推定され、また一方13 KDaを示す物質はバス染色陰性であることから、糖鎖を有しない。この16 KDaを示す物質は、以下に示す分析から13 KDaの物質に糖鎖が付加したものと考えられる。

【0011】本発明の物質は、固定化したカルボキシメチル化パパインによるアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過により分子量の異なる2つの画分として分離される。この分離した画分を逆相クロマトグラーフィーに付すことにより、それぞれ単一のピークとして回収することができる。この逆相クロマトグラフィー単一ピークをSDS-PAGEに付してもやはり単一のパンド50

として検出される。このバンドの分子量は上記に示す値である。この逆相クロマトグラフィーの単一ピークを分取し、気相法によるアミノ酸シーケンサー(ABI社製120A型アナライザー)によりN末端アミノ酸配列を分析したところ、1ピークから2つのアミノ酸配列が検出された。このN末端アミノ酸配列は、配列表配列番号1と配列番号2に記載したものである。このような配列が共存していることは、分泌の過程における蛋白質のプロセッシングに由来すると考えられ、Arg末端とGly末端の2種類が共存していることが確認された。このアミノ酸配列は16KDaの物質、13KDaの物質とも

共通であり、13KDaの物質は、パス染色陰性で糖鎖

が結合していないためにこのような分子量を示すものと

【0012】またシスタチンファミリーのうち、糖鎖を有する物質として知られているキニノーゲンと比較した場合、本発明の物質の糖鎖を有する物質の分子量は16±2KDaである。これに対してキニノーゲンには分子量が78KDaの高分子キニノーゲンと分子量が45KDaの低分子キニノーゲンが知られているが、本発明の糖鎖を有する物質は分子量が16±2KDaであり、分子量測定により明確にキニノーゲンとは区別できる。このように、本発明により提供される物質は新規なシスタチン様システインプロテアーゼインヒビターということができる。さらに後述するように本発明物質は乳中から分離されるシスタチンファミリー2の物質と比較して、システインプロテアーゼの阻害活性は同程度の値を示す。

【0013】本発明の物質はヒト、ウシなど哺乳動物の

乳から回収することができるが、特にウシ乳中から容易 に回収することができる。本発明の物質は泌乳期間のう ち特に初乳中に大量に含有されるが、通常の乳中にも含 有される。これらの乳を原料として、上述の文献に記載 されているように、代表的なシステインプロテアーゼで あるパパインなどの親和性によるアフィニティークロマ トグラフィー等の操作により分離することができる。 【0014】すなわち、ウシ脱脂初乳に、終濃度0.5Mと なるようにNaClを添加し、これをカルポキシメチル化パ パイン固定化担体を用いたアフィニティークロマトグラ フィーに供し、ウシ初乳シスタチン類の濃縮画分を調製 する。この画分には既知のシスタチンと本発明物質を含 有している。特に、NaClの添加により非特異的吸着を抑 制し、比活性の高い濃縮画分を調製できる。あるいは、 酸によるホエー画分を調製し、この酸性ホエー画分を硫 安沈殿により塩析する画分を集め、さらに膜処理により 脱塩したものを出発材料として、カルポキシメチル化パ パイン固定化担体を用いたアフィニティークロマトグラ フィーに供し、ウシ初乳シスタチン類の濃縮画分を調製 する。さらに、この画分をゲル濾過クロマトグラフィー 等のクロマトグラフィーによって、本発明物質であるシ

スタチン様システインプロテアーゼインヒビターと既知 のシスタチンとを分離することができる。精製にあたっ ては、この他に蛋白質の精製方法として知られている逆 相クロマトグラフィーやHPLCなどの方法を組み合わ せても良い。

【0015】本発明物質のパパインに対する阻害活性は Barrettらの方法 ("Methods in enzymology" Vol.80 1 981, pp771) に準じて測定することができる。即ち0. 1 MペンゾイルーD, L-アルギニン-4-ニトロアニ リド (Benzoil-D,L-arginine-4-nitroanilide)のジメチ 10 ルスルホキシド溶液を基質とし、測定用の緩衝液とし て、2mMのEDTAを含む、20mMリン酸緩衝液に 使用直前にシステインを終濃度8mMとなるように添加 した溶液を用いて、比色法により酵素の活性を測定する ことにより、酵素の阻害率を求める方法である。本発明 の新規システインプロテアーゼインヒビターは、乳中の シスタチンを対照として阻害活性を測定した場合、蛋白 質あたりの阻害活性はほぼ同程度の阻害率を示す。

【0016】本発明物質をゲル等電点電気泳動法(Fast system Pharmacia社製)により等電点を測定したとこ ろ、pIが、16KDaの物質は4.3-5.2を示 し、13KDaの物質はpI 5.2-5.8を示して いる。

【0017】本発明物質のうち、13KDaを示す物質 と16KDaを示す物質をそれぞれ、還元ピリジルエチ ル化し、アクロモバクター・リティカスのプロテアーゼ あるいは、臭化シアンを用いて常法によって加水分解を 行い、ペプチドマッピングを行ったところ、糖鎖の結合 していると推定されるペプチド以外は、まったく一致し た。このことから本発明のシステインプロテアーゼイン ヒビターは、同一のアミノ酸配列を有しており、N末端 が異なった物質および、糖鎖の結合したものと結合して いないものが、存在していることが推定された。アミノ 酸配列の推定一次構造を図5に、また13KDaでN末 端がデリーションされていないもののアミノ酸配列の分 析結果を配列表配列番号5に示した。なお、Xaa はアミ ノ酸名が確定していない。この配列を公知のシスタチン ファミリーのアミノ酸配列とホモロジーを比較した結果 を図6に示した。この結果から、本発明の新規システイ ンプロテアーゼインヒビターは、シスタチンファミリー 40

比活性[unit/mg] = { (A₁-A₁) ×1.43} / { 8.8×30× W₁ }

A: インヒピターフリーの吸光度

A: : サンプルの吸光度

W:: サンプル溶液中のタンパク質量[mg]

【0021】(2)硫安分画

分娩後1日以内に搾乳したウシ初乳91から遠心分離に より脱脂乳を調製し、常法に従い酸ホエーを調製した。 ホエーに飽和度35%になるように硫安を添加し生じた 沈殿を遠心分離により除去した。さらに飽和度55%と なるように硫安を添加し、生じた沈殿を遠心分離により 50

2のコンセンサス領域とは高い相同性を示すが、それ以 外の部位のアミノ酸配列は異なっており、シスタチンフ アミリーに属する新規なシステインプロテアーゼインヒ ピターであると言える。

【0018】本発明の物質は乳中に常在する蛋白質であ り、その安全性は高いものと考えられる。従って、既知 のシスタチンに見出される、抗ウイルス剤、抗アレルギ 一剤、骨疾患治療剤として用いることが可能であり、必 要に応じて製剤化するか、あるいは単独で用いることが 可能である。また食品や飲料中に混入させて用いること もできる。医薬品として用いる場合には注射剤、経口 剤、座剤などが例示できる。また蛋白質製剤は通常注射 剤として用いられることが多く、薬学的に有効な量の本 発明物質を含有させ、製薬学的に許容しうる安定剤や賦 形剤、等張化剤、無痛化剤、防腐剤、緩衝剤などを含有 させて製剤とすることができる。

【0019】以下に実施例を示し本発明をさらに詳細に 説明する。

【実施例1】

新規システインプロテアーゼインヒビターの精製

(1) インヒビター活性測定

システインプロテアーゼに対するインヒビター活性は、 パパインに対する阻害活性を Barrett らの方法("Meth ods in enzymology" Vol.80 1981, pp771) に準じて測 定した。0.1Mペンゾイル-D,L-アルギニン-4 ーニトロアニリド(Benzoil-D,L-arginine-4-nitroanili de) ジメチルスルホキシド溶液を基質とし、測定用の緩 衝液として、2mMのEDTAを含む、20mMリン酸 緩衝液に使用直前にシステインを終濃度8mMとなるよ うに添加した。パパインを0.5mg/m1の濃度で、 システインを含まない測定用緩衝液に溶解した。また、 反応停止用溶液として30%酢酸溶液を使用した。測定 は、以下の手順で行った。測定用チューブに1mlシス テインを含むリン酸緩衝液と0.1mlのパパイン溶液 を入れ、37℃で5分間インキュベートした。次いで、 試料溶液O.1ml基質溶液30μlを加え攪拌した。 37℃で30分間反応後、0.2m1の反応停止液を加 え、410mmの吸光度を測定した。インヒビター活性 は次式(I)より求めた。

[0020]

(I)

回収した。回収した沈殿に含まれる硫安を除去するた め、分画分子量6KDaのフォローファイバー型UF膜 (旭化成製)によりDF処理した。すなわち、沈殿を5 0mMリン酸-0.5M NaCl緩衝液(pH7.

に溶解し、同じ緩衝液に対しDF処理した。

【0022】(3)カルポキシメチル化パパインアフィ ニティークロマトグラフィー

カルボキシメチル化パパインをトレシルトヨパール(Tr esyl-Toyopearl, 東ソー製) に結合させた担体を50Φ

7

×150mmのカラムへ充填後、50mMリン酸-0. 5M NaC1緩衝液 (pH7.0) で平衡化した。こ のカラムへ、先の硫安飽和度35-55%沈殿画分を通 液し、システインプロテアーゼインヒビターを吸着させ た。通液後、平衡化に使用した緩衝液に 0. 1% Tween -20 を添加した溶液でカラムを洗浄した。次いで、20 mM酢酸-0.5M NaCl溶液でシステインプロテ アーゼインヒビターを溶出させ、溶出画分を直ちに1M NaOH溶液で中和した。

活性 [%] = { (A。 - A,) / A。} × 100

【0025】結果を図1に示す。アフィニティークロマ トグラフィーで調製した画分を分画分子量6KDaのフ オローファイバー型UF膜(旭化成製)により濃縮し た。0.1M 炭酸水素アンモニウム緩衝液で平衡化し たカラム (50 ø×750 mm) に通液した。溶出液を 分取し、インヒビター活性を示す画分のうち、既知のシ スタチンと明らかに異なる二つのピークで、図1に矢印 で示した画分(СРІп, СРІп)を回収し、それぞ れ、逆相クロマトグラフィーに供した。

【0026】(5)逆相クロマトグラフィー VYDAC 214TP54 (Vydac社製) カラム (4.6 mm×25 0mm) を用いた、逆相クロマトグラフィーを実施し た。カラムの平衡化には、0.08% TFA (トリフ ロロ酢酸) を添加した5%CH3CN-95%H2Oを、 溶離液として、0.06% TFA添加した80% C H3CN-20% H2Oを使用し、1%/分の直線グラ ジエントで溶出した。各ピークを分取し、インヒピター 活性を測定した結果(図2)、図中にPnおよびPnと 示したビークに活性が認められた。活性画分の一部を同 一条件で逆相クロマトグラフィーに供した結果、それぞ 30 れ単一のピークを示した。2つの活性画分を凍結乾燥

【0023】(4) ゲルフィルトレーション アフィニティークロマトグラフィーで調製した画分に対 し、Sephacryl S-200HR(Pharmacia製) を用いたゲルフ ィルトレーションを実施した。各画分の活性は実施例1

(1) に示したようにして A。: インヒピターフリーの 吸光度、 A: : サンプルの吸光度を求め、次式(II)によ って相対活性値を求めた。

[0024]

(II)

し、P.i.およびP.i.からそれぞれ、0.47mg、0. 68mgの凍結乾燥標品が得られた。

[0027]

【実施例2】本実施例においては、実施例1で得たP... およびPぃの二つのシステインプロテアーゼインヒビタ 一の特性値を測定した例を示す。

(1) SDS-PAGE

図3に逆相クロマトグラフィーで精製した2種のインヒ ビターのSDS-PAGEの結果を示した。P.1および 20 P. 共に単一バンドを示し、不純物は認められなかっ た。また、還元、非還元条件下でも変化が無いことか ら、両者共に単一のポリペプチドから成ることが示され た。また、P.,およびP.,の分子量は、それぞれ約16 KDa、約13KDaであることが確認された。

【0028】(2)インヒビター活性

精製した16KDa、13KDaおよび既知の初乳シス タチンのパパインに対する阻害活性を実施例1に記載し た方法に従って比較した。比較測定の結果を表1に示し

[0029] 【表1】

初乳システインプロテアーゼインヒビターの活性

比活性	CPI,, 11	CPI, 111	coCys,,		
[unit/mg]	0.310	0.284	0.270		

- 1) 16kDa システインプロテアーゼインヒピター
- 2) 13kDa システインプロテアーゼインヒビター
- 3) 初乳シスタチン

【0030】表1から、新たに得られた2種のインヒビ ターは、既知の初乳シスタチンと同程度の比活性を示し た。

【0031】 (3) N末端アミノ酸配列

精製した16KDa、13KDaの分子量を有するシス テインプロテアーゼインヒビターのN末端アミノ酸配列 分析を気相法によるアミノ酸シーケンサーを用いて実施 した。両者ともほとんどのサイクルで2つのシグナルを 示し、かつ両者のシグナルは完全に一致していたことか

ことが確認された。また、2成分の内、一方のペプチド 鎖のN末端が2残基欠如していると仮定した場合、18残 40 基が一致する2種の配列が得られた。このことから、分 析に供した2つの画分中には、それぞれ2種のインヒビ ターが含まれ、2種のうち、一方のインヒビターは、N 末端の2残基を欠如したフォームであると判断できた。 この配列を配列表配列番号1、配列番号2に示した。ま た比較のために既知の初乳シスタチンのN末端アミノ酸 配列を配列表配列番号3に、ヒトシスタチンCの配列を 配列表配列番号4に示した。これらの既知のシスタチン と本発明の新規システインプロテアーゼ阻害物質は全く 異なる配列であった。これらの4物質の比較した配列を ら、両画分とも同一の2成分のペプチド鎖を含んでいる 50 図4に示した。本法で精製したシステインプロテアーゼ

q

インヒビターのN末端アミノ酸配列は、既知の初乳シスタチンやその他の既知のシスタチン類とも全く相同性を示していなかった。

【0032】(4)精製13KDaのアミノ酸配列分析と一次構造解析

精製した13KDaのシステインプロテアーゼインヒビターの全アミノ酸配列の分析を行った。精製システインプロテアーゼインヒビターを還元ビリジルエチル化し、アクロモバクター・リティカス(Achromobacter lyticus)プロテアーゼ(API)あるいは臭化シアン(CNBr)で加水分解し、ついで逆相クロマトグラフィーによりペプチドを分離し、アミノ酸配列の分析を行った。アミノ酸配列の分析は上記(3)と同様に行い、全121アミノ酸配列を確認した。N末端アミノ酸に相当する部分は、(3)で述べたように2つのビークが観察され、一方はグリシンからはじまっており、一方は、N末端アミノ酸を決定することができなっかった。121アミノ

酸の配列を図5および配列表配列番号5に示した。

10

【0033】この配列を公知のシスタチンファミリーに属するシステインプロテアーゼインヒビターと比較を行った。それぞれのアミノ酸配列を図6に示した。配列中には、カゼインキナーゼ (casein kinase II) によるリン酸化サイト(#14 Ser, #35Ser)が2箇所存在し、リン酸化蛋白質であることが推定された。またシスタチンファミリーのコンセンサス配列が含まれていた。13KDaのシステインプロテアーゼとシスタチンファミリー2のホモロジーをSWISS-PORT(R24.0 December 1992)を用いて解析を行い、下記表2の結果を得た。公知のシスタチンファミリーとは異なった蛋白質であることが確認できた。

[0034]

【表2】本発明システインプロテアーゼインヒビターに 対する公知ファミリー2シスタチンのホモロジー

システインプロテアーゼインヒビター	%			
卵白シスタチン	36.5			
初乳シスタチン	34.5			
ヒトシスタチンC	33.9			
ラットシスタチンC	42.4			
ヒトシスタチンS	33.0			
ヒトシスタチンSN	38.0			
ヒトシスタチンSA	31.2			
ラットシスタチンS	32.8			
ヒトシスタチンD	31.0			

【0035】(4)その他の特性

精製した16KDa、13KDaのシステインプロテアーゼインヒビターの糖鎖の有無をPAS染色で確認した。その結果、16KDaのインヒビターのみが陽性を示し、糖鎖を含有していることを確認できた。

【0036】また、両画をゲル等電点電気泳動法(Fast system Pharmacia 社製)に供し、p I 値を求めた。その結果、16 K D a のインヒビターのp I 値は 4.3 - 5.2 を示し、13 K D a のインヒビターのp I 値は、5.2 - 5.8 を示した。以上の結果から、本発明物質 40 は、糖鎖を含有する分子量16 K D a と糖鎖を有しない 13 K D a の 2 つの分子量を持つ物質であって、N - 末端アミノ酸配列が2種類あることが判明した。

[0037]

【発明の効果】本発明により新規システインプロテアーゼインヒビターが提供される。本発明により提供される物質は既知のシスタチンと比較してNー末端アミノ酸配列、および全アミノ酸配列の異なる新規物質であり、破骨細胞の骨吸収作用に対する阻害効果を有し、骨の老化抑制を目的とした食品原料や医薬品原料として有用である。

[0038]

【配列表】配列番号:1

配列の長さ22

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状 配列の種類:ペプチド

配列

Arg Pro Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn

10

15

Asp Pro Gln Val Gln Lys

20

5

50 配列の長さ20

【0039】配列番号:2

15

```
11
                                               配列の種類:ペプチド
配列の型:アミノ酸
トポロジー:直鎖状
               配列
               Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn Asp Pro
                                               10 -
                                                               15
                1
               Gln Val Gln Lys
                                                トポロジー:直鎖状
【0040】配列番号:3
                                               配列の種類:ペプチド
配列の長さ22
                                            10
配列の型:アミノ酸
                配列
                Arg Leu Leu Gly Gly Leu Met Glu Ala Asp Val Asp Glu Glu Gly Val
                              5
                Gln Glu Ala Leu Ser Phe
                           20
                                                トポロジー:直鎖状
【0041】配列番号:4
                                               配列の種類:ペプチド
配列の長さ22
配列の型:アミノ酸
                配列
                Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Gly Val
                Arg Arg Ala Leu Asp Phe
                           20
                                                トポロジー:直鎖状
 【0042】配列番号:5
                                                配列の種類:ペプチド
配列の長さ121
配列の型:アミノ酸
                配列
                 Xaa Pro Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn .
                                                10
                 Asp Pro Gln Val Gln Lys Ala Ala Gln Val Ala Val Ala Asn Tyr Asn
                                             25
                 Met Gly Ser Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Arg Asp Ile Thr Ile Leu Arg
                                         40
                 Ala His Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys Tyr Tyr Leu Thr Val Asp
                                                       60
                 Met Glu Ser Thr Ala Cys Arg Lys Ser Ala Val Ala Gly Asp His Val
                                                    75
                                   70
                 Asp Leu Thr Thr Cys Pro Leu Ala Ala Glu Ala Gln Gln Glu Lys Leu
                                                90
                 Arg Cys Asp Phe Glu Ile Leu Val Val Pro Trp Lys Asn Ser Ser Gln
                                                             110
                           100
                 Leu Leu Lys Trp Asp Cys Val Ser Leu
                                         120
                                                トポロジー:直鎖状
 【0043】配列番号:6
                                                配列の種類:ペプチド
配列の長さ119
配列の型:アミノ酸
                配列
                 Gly Asp Arg Lys Val Gly Glu Leu Gln Glu Leu Ser Pro Asn Asp Pro
```

5

Gln Val Gln Lys Ala Ala Gln Val Ala Val Ala Asn Tyr Asn Met Gly

25 20 Ser Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Arg Asp Ile Thr Ile Leu Arg Ala His 45 40 Ser Gln Leu Val Ala Gly Ile Lys Tyr Tyr Leu Thr Val Asp Met Glu 60 Ser Thr Ala Cys Arg Lys Ser Ala Val Ala Gly Asp His Val Asp Leu 70 75 65 Thr Thr Cys Pro Leu Ala Ala Glu Ala Gln Gln Glu Lys Leu Arg Cys 90 85 Asp Phe Glu Ile Leu Val Val Pro Trp Lys Asn Ser Ser Gln Leu Leu 110 105 100

Lys Trp Asp Cys Val Ser Leu

【図面の簡単な説明】

【図1】システインプロテアーゼインヒビターのゲル濾 過による分画パターンを示す。

【符号の説明】

--●-- 活性を示す。

—— OD280nmの吸光度を示す。

パターンを示す。これは、図1に示した画分をそれぞれ 逆相HPLCに付して得られたバターンを同時に記載し たものである。

【図3】HPLCにより分画した本発明システインプロ テアーゼインヒビターのSDS-PAGEのパターンを 示す。

【符号の説明】

- 1 分子量16KDa システインプロテアーゼインヒ ピターの還元状態のパターン
- ピターの還元状態のパターン
- 3 分子量16KDa システインプロテアーゼインヒ ビターの非還元状態のパターン
- 4は、分子量13KDa システインプロテアーゼイン ヒピターの非還元状態のパターン
- 【図4】本発明のシステインプロテアーゼインヒビター

のN末端アミノ酸配列、既知物質である初乳シスタチ ン、ヒトシスタチンCのN末端アミノ酸配列の比較を示 す。

【符号の説明】

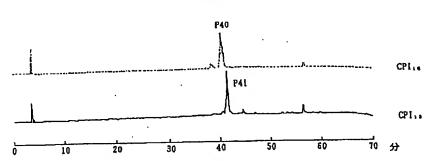
- a: 本発明のシステインプロテアーゼインヒピターのN 末端アミノ酸配列
- 【図2】ゲル濾過によって得られた画分の逆相HPLC 20 b: 本発明のシステインプロテアーゼインヒピターのN 末端アミノ酸配列
 - c: 初乳シスタチンN末端アミノ酸配列
 - d: ヒトシスタチンC

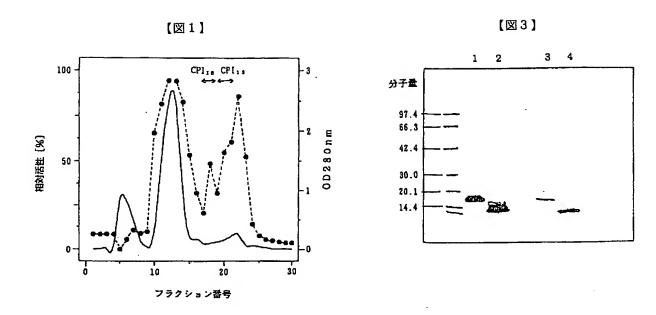
【図5】本発明による、13KDaのシステインプロテ アーゼインヒビターのアミノ酸配列の一次構造を示す。 【図6】本発明による、13KDaのシステインプロテ アーゼインヒピターと公知のシスタチンファミリーの第 40番目までのアミノ酸配列の相同図を示す。

【図7】本発明による、13KDaのシステインプロテ 2 分子量13KDa システインプロテアーゼインヒ 30 アーゼインヒビターと公知のシスタチンファミリーの第 41番目から85番目までのアミノ酸配列の相同図を示 す。

> 【図8】本発明による、13KDaのシステインプロテ アーゼインヒビターと公知のシスタチンファミリーの第 86番目から121番目までのアミノ酸配列の相同図を 示す。







【図4】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

a: ArgProGlyAspArgLysValGlyGluLeuGlnGluLeuSerProAsnAspProGlnValGlnLys

b: — GlyAspArgLysValGlyGluLeuGlnGluLeuSerProAsnAspProGlnValGlnLys

c: ArgLeuLeuGlyGlyLeuMetGluAlaAspValAspGluGluGlyValGlnGluAlaLeuSerPhe

d: ArgLeuVALGlyGlyProMetAspAlaSerValGluGluGluGlyValArgArgAlaLeuAspPhe

【図5】

> ‡Serus. Serss. リン酸化部位 ‡Asauss. グリコシル化部位

【図6】

ls. thシスタチンS hsn, thシスタチンSA hsn, thシスタチンSN hd, thシスタチンD hc. tトシスタチンC bc. 初乳シスタチン 牛乳山来新規システインアロテスーヒインヒサー cc. 卯白シスタチン ファミリー 2 シスタチンのコンセンサス配列 グリコシル化部位

lısın TrpSerProLysGiuGiuAspArgileileProGiyGiylleTyrAsnAlaAspLeuAsnAspGiuTrpValGinArgAlaLeullisPheAlaileSerGiuTyrAsnLysAlaThrLys — AspAspTyrTyr HiscinThrLeuSerCyst.euclyHisPheLcucling IIIcInLysSerSerMetGiuGluGluGluGlyAlaSerGiuAlaLeuAsnTyrAlaYaIAsnGluTyrAsnGluLysAsnSer --- AspLeuTyrLcu A LaciyTurserArgProProArgLoulou() (4) AlaCinGluAlaAspAlaSerGluGluGlyValGlnArgAlaLeuAspPheAlaValSerGluTyrAsnLysGlySerAsn — AspAlaTyrHis hsa TrpSerProLysGluGluAspArgllelleGluHJJBly11cTyrAspAlaAspLeuAsnAspGluArgValGlnArgAlaLeuHisPheVallleSerGluTyrAsnLysAlaThrGlu — AspGluTyrTyr lid 61ySerAlaSerAlaGlaScrArgTbrLcuAlaGjjjGlyllellisAlaTbrAspLcuAsnAspLysSerValGlaArgAlaLeuAspPheAlalleSerGluTyrAsaLysVallleAsnLysAspGluTyrTyr Argi.euLeu<mark>giy</mark>biyLeuMetGiuAiaAspVatAsnGiuGiuGiuGiyValGinGiuAiaLeuSerPheAlaVaiSerGiuPheAsnLysArgSerAsn — AspAiaTyrGin he GlyserSerProGlyLysProProArgLenValGlyClyProMetAspAlaSerValGluGluGluGlyValArgAlaLeuAspPheAlaValGlyGluTyrAsnLysAlaSerAsn — AspMetTyrHis lıs SerSerSerLysGiluGluAsnArgllelleProGilyBlylleTyrAspAlaAspLeuAsnAspGluTrpValGlnArgAlaLeuHisPheAlalleSerGluTyrAsnLysAlaThrGlu — AspGluTyrTyr <u>ت</u> ೫

KaalroGiyAspArgiysVaii]jjiluLcuGinGiuLeu配配了roAsnAspProGinVaiGinLysAlaAiaGinVaiAiaVaiAiaAsnTyrAsnMeiGiy配到Asn — SerAspTyrTyr

cc Yall.cuClyScrGluAspArgSerArgLeuLeup FighlaProValProValAspGluAsnAspGluGlyLeuGlnArgAlaLeuGlnPheAlaMetAlaGiuTyrAsnArgAlaSerAsn — AspLysTyrSer

Ξ

Best Available Copy

(12)

特開平7-126294

[図7]

	.u	SerDys	SerCys		— — Ashčys:	— ThrCys	— Thricys	ThrCys	— AsnCys	Asn <u>¢yş</u>
	<u>بي</u>	<u>5</u>	<u>မ</u>	— AsnCys	.달		 E	. E	-San	S and
	Ē	ഗ് (Š	¥ 	· ~	ī	โ	Ī	ĩ	ī
	=	,	1		¦ .	i	i	i	i	i
	చ	l 1	-	1	1	i	i	i	i	i
	IAs	1	1			i	i	i	i	ì
8	SVa	1	Į	1	i	i	i	i	i	i
	를	1	٩	5	<u>_</u>	- -	- ds	-ds	<u> </u>	ds.
	λ¥S	뎔	uAs	¥.	Į,	γna	γna	eny	euT	Yna
	ည္ထ	12	Ę	=	J.	Ę,	ار ا	Sal	spl,	Sal
	X	10	яАѕ	οYS	Ž.	¥ ·	5	o -	Jy A	You so
	aVa	ē	PA	핕	Ē	<u></u>	ם	- L	1nG	급.
	Ŧ	š	ភ្ន	5	ភ្ជ	ē	S	D.a	hrG	erG
	Se	sSe	sSe	£	3Se	280	185	185	rst	YSS
	<u>5</u>	oty	rLy	-5	Į.	5	뒨	<u> </u>	eu L	Ī
	.≨		Ę	€	.£	मृं	-ਛੂ	.দূ	∵કું	ছূ
2	<u>S</u> .	ۇ	.ಭ	ఫై	.ಫಿಸಿ	లై	త్తో	-ଞ୍ରି…	ల్జ్	<u>2</u>
	¥	Ē	Ē	€	€	Ξ	Ξ	Ξ	=	T.
	Ē	Ę	ET.	ET I	[]]	E S	₩.	£2	/sT	=
	Se	Art	yAr	yAr	yĀr	yĀŗ	λŁ	*	ا <mark>ب</mark> ار	X
	5	[S] 2	ğ	9	<u> </u>	55,	55	5	9,	9
)¥e	=	uL e	er:c	₩ N	υVa	N ₂	S N	3:	ZS.
	ĭS.	5	<u></u>	191	<u> </u>	5	5	29	=	1
	rVa	nVa	ρVa	pVa	ρVa	P _d	λΛ	Ë	Sp.Vg	SnV
	₫	5	ηγ	nγs	ıγ	cγs	eAs	E¥	JeA:	JCA:
	Ę	3	eLe	5	r F	<u></u>		5	1eP	<u>=</u>
පි	Ξ	Ē	든	Ę	F.	Ę	흔	<u>=</u>	leP.	Ę
	Š	sTy	nŢ	Ę	Ę	J.	J.	Ę	/s/l	Į.
	Ľ,	Ś	ιγs	¥ S	cAs	JAs	ΙVS	11/8	Į.	¥.
	Ξ.		ž.,	. Ž.		سگی	: .	١١٥	بيكس	anŠ
	2	e a	Ę#	التجا	١٩w	Ęĸ	Ğ.	뒃침	# @	### <u>#</u>
	<u> </u>		<u>.</u>	<u>≦</u>	.Ž	.E.	. 프.,,	.프.,	ÆM	······ = : = :
	5	######################################	2 .	الجا	\$		الليخ ا	- E		2
	. 5 		2			<u> </u>	.Ē.,,	Æ	. Š.	
	5		Ę	التهالة				₽ ₹	<u> </u>	<u>e</u>
	SSe	syr	gLy	gf.y	류	<u> </u>	158	128	뒨	5
ಜ	ä	al.y:	ΨV	¥	as as	Ψ¥	aAr	aAr	<u>.</u>	<u>a</u>
	Ϋ́	N.	8A1	KA I	β¥Ι	RAI	β¥	18.	ν _α	γ
	Ψ	သို့	ΝĽ	Ϋ́	ΙĀΓ	ıγı	ıγı	¥.	sγs	3
	3	=	٧a	Y.	.V.	==	=======================================	1	Ξ,	×
	=	le ^V al	Kal Kal	ام ا	Na.	الا 3 و	SVa 1°a	gVa 2.0	uVa	nVa
	Ē	Arg	Ark	in in	بَوْ	Ξ	IJΨE	пу	<u>:</u>	15
	<u>=</u>	Val	Va I	15.	1 10	J.c.) Fe	i E	IVa	ole
	Лзр	Val	Val	۸la	۸Ia	1 2	Pre	;let	şVa.	7.
	Arg.	λrg	Arg	۸۲۶	۸rR	ÅrR	Arr	Ars	.Yr	γLξ
	171 TyrargaspileTinilebeudrgaiallisSeraineuVala lebysTyrbeuTinvalasphetGiuSerThraiagiskrgbysSeralavalalaGlyaspilisValaspleuThrThräys	.c. SerkrgValValArgVallieSerAlaLysArg <u>AlfLewAilSerAlf</u> ElleLysTyrlleLeuGlnValGiulieGlyArgThrThrLysEroLysSerSerGlyAspLeuGln	ic SerargvalvalargvalvalargalaArgLy	Serkega iai.cuGinva iva ikega iakegi,yshibi icharan iaka iksa Tyrihol.cukspva iGlul.cuGiyarg ThrThrCysthrLysThrGinProasn leuasp	.c. SerkrgalalieGinValValdrgalakrgi,yshid.euValdlakliyiledsaTyrTyri.cudspValGiuMetGiyArgThrThrbysThrLysSerGinThrAsnLeuThr —	Årr	À:R	Ar.8	rs ScrArgValValGluValLysAspValGlnLysGlnValValValValValThrLysPhePheAspVallIcLeuGlyLysThrlleCysLeuLysthrGlnGlyAspLeuThr **	ind ScrargProteuGlnValMetAlaAyrGlnGLDPleValGlyGlyGlyGlyGlyGlyGlyArgTbrTllrCygThrLysSerGlnProAsnLeuAsp
	• -	- -		-						

ラッミリー2シスタチンのコンセンサス配列
 グリコシル化部位
 リン酸化節位
 CPI、4乳血米新規がテインアロテーセイスヒター cc. 卵白シスタチン bc. 初乳シスタチン hc. ヒトシスタチンC
 rc, テャトシスタチンC hs. ヒトシスタチンS hsn. ヒトシスタチンSA hsn. ヒトシスタチンSN hd. ヒトシスタチンD

【図8】

hc ProPhellisAspGInProllisLeul,ysArgLysAlaPheCysScrPheGlallcTyrAlaVai<u>PicTri</u>GInGlyThrMelThrLeuSerUrsSerThrCysGlnAspAla

be ProthellisAsnGlufrollisLeuLysArgGluL, rsLeuCysSerPheGluValTyrValValValTiMetAsnThrlleAsnLeuValLysPheSerCysGluAsn

GluPhcHisAspGluProGluMctAlaLysTyrThrThr&ysThrPheYalValTyrSerile<u>ProTrin</u>LeuAsnGlnHeLysLeuLeuGluSerLys&ysGln

2

CPI Proleuklaklaciuklacin — CinciulysleukrecyskspPheciulieleuValValliciteus skinserSercinleuteulysTrpkspCfitValSerleu

ProPhellisAspGlnProllisLeuMetArglysAlal.euCysSerPheGlnHcTyrSerValHcTfpDysGlyThrlHsThrLeuThrLysSerSerCysLysAshAla

<u>ن</u> ـ

hsa AlaPhellisGluLeuProGluLeuGlnLysLysGlnLeuCysSerPhcGlnlleTyrGluValProTlpGluAspArgHeLSerLeuValAsnSerArgCysGlnGluAla rs ProteudsnelucludladspelnelnelnelneluliseluPhecysSerPheValVallisdspileProteudsnevalteuteuSerSerSerSerits hsn AlaPhellisGluGinProGluLeuGluLystysGluLeuizysSerPheGlulleTyrgluValitoTfWoluAsnArgArgSerLeuValLysSerArgCysGluGluSer lis AlathellisGluGlyProGluLcuGlnLysLysGluLcuCysScrPhcGlullcTyrGluVal<u>)FoTER</u>GluAspArgAsnSerLcuValAsnSerArgCysGlnGluAla ファミリー2シスタチンのコンセンサス配列 ::::=

Isan, トトンスタチンSA hsn, トトンスタチンSN hd, トトンスタチンロ hg トレンスタチンC cc, 卵白シスクチン bc. 初乳シスタチン hs, thシスタチンS CP1, 牛乳山来新規システインフロテアーヒインヒヒター **ポシスタチンC** グリコシル化部位 リン酸化解位